

Entwicklung von Bakterienstämmen zur Herstellung der essentiellen Aminosäure L-Lysin

Sahm, Hermann

Veröffentlicht in:
Jahrbuch 1999 der Braunschweigischen
Wissenschaftlichen Gesellschaft, S.91-101



J. Cramer Verlag, Braunschweig

HERMAN SAHM, Jülich

Entwicklung von Bakterienstämmen zur Herstellung der essentiellen Aminosäure L-Lysin

1. Einleitung

Aminosäuren sind als Bausteine der Proteine bei allen Lebewesen – Mensch, Tier, Pflanze, Mikroorganismus – essentiell. So besteht der menschliche Körper zu ca. 15-20 % aus Proteinen, die eine Vielzahl verschiedener lebensnotwendiger Funktionen erfüllen. Am Aufbau der Proteine sind zwanzig verschiedene Aminosäuren beteiligt, von denen der Mensch acht – z.B. L-Lysin – nicht selbst synthetisieren kann sondern mit der Nahrung aufnehmen muß. Im Durchschnitt benötigt der Mensch deshalb pro Tag etwa 70 g Proteine, um seinen Bedarf an essentiellen Aminosäuren decken zu können. Bei Aminosäuremangel kommt es zu Einschränkungen im Stoffwechsel, die Abwehrkräfte werden geschwächt, und über einen längeren Zeitraum führt ein Mangel an den lebenswichtigen Aminosäuren zu Störungen bei Organfunktionen und schließlich zum Tod.

Der Bedarf an proteinreichen Nahrungsmitteln wächst überdurchschnittlich mit den steigenden Ernährungsansprüchen der Weltbevölkerung, die in nur 11 Jahren von jetzt 6 auf 7 Milliarden Menschen im Jahr 2010 zunehmen wird (KIRCHER und LEUCHTENBERGER 1998). Mit klassischen Agrarmethoden wird diese 'Proteinlücke' nicht zu schließen sein, denn der wachsenden Weltbevölkerung wird pro Kopf immer weniger landwirtschaftliche Nutzfläche zur Verfügung stehen. Eine Möglichkeit zur Lösung dieses Problems besteht nun darin, bei pflanzlichen Nahrungs- und Futtermitteln, die häufig einige der für Mensch und Tier essentiellen Aminosäuren nur in sehr geringen Mengen enthalten, durch Supplementierung mit diesen limitierenden Aminosäuren den Nährwert erheblich zu steigern. Der Nährwert von Weizenmehl ist beispielsweise aufgrund des geringen L-Lysingehaltes niedrig; durch Zugabe von 0,2 % L-Lysin kann der Nährwert verdoppelt werden.

Zur Zeit liegt der Weltmarkt für Aminosäuren bei über 1,5 Millionen Tonnen pro Jahr, was einem Marktwert von über 5 Milliarden DM entspricht (LEUCHTENBERGER 1996). So

* Vortrag an dem wissenschaftlichen Kolloquium anlässlich der Verleihung der Carl-Friedrich-Gauß-Medaille

haben Aminosäuren eine große wirtschaftliche Bedeutung im Nahrungsmittelbereich, jährlich werden z.B. über 800.000 Tonnen L-Glutaminsäure als Geschmacksverstärker hergestellt. Im Futtermittelbereich werden insbesondere die Aminosäuren DL-Methionin (350.000 t/Jahr), L-Lysin (350.000 t/Jahr) und L-Threonin (15.000 t/Jahr) zur Erhöhung des Nährwertes eingesetzt. Aminosäuren sind aber auch im Bereich der Medizin von sehr großer Bedeutung, wie z.B. als wichtige Komponenten von Infusionslösungen oder Therapeutika. Ferner spielen Aminosäuren bei der Synthese von Agrochemikalien wie Herbiziden und Fungiziden eine wichtige Rolle.

Zur großtechnischen Herstellung von Aminosäuren gibt es verschiedene Verfahren. So können L-Aminosäuren aus Proteinhydrolysaten (z.B. die Aminosäure L-Cystein aus Haaren) gewonnen werden. Eine weitere Möglichkeit der Aminosäureproduktion bietet die chemische Synthese, wie z.B. die Produktion von DL-Methionin. Hierbei entsteht allerdings ein Racemat mit einem Anteil von 50 % D-Methionin und 50 % L-Methionin. Obwohl alle Lebewesen die Aminosäuren bis auf wenige Ausnahmen ausschließlich in der L-Form verwenden, kann Methionin als Racemat von unseren Haustieren verwertet werden. Die meisten Aminosäuren, die heute produziert werden, werden mit Hilfe von Bakterien oder Enzymen hergestellt, da bei diesen biotechnologischen Verfahren ausschließlich die biologisch aktiven L-Aminosäuren gebildet werden (ESAKI et al. 1996).

Die meisten Bakterien sind wohl in der Lage, die 20 lebensnotwendigen Aminosäuren aus einfachen Bestandteilen der Nährmedien zu synthetisieren. In der Regel produzieren die Mikroorganismen die einzelnen Aminosäuren aber nur in solchen Mengen, wie diese für die eigene Biosynthese von Proteinen und anderen Zellbestandteilen benötigt werden, so daß normalerweise nur sehr geringe Mengen ins Nährmedium ausgeschieden werden. Dies beruht darauf, daß die Organismen im Laufe der Evolution Mechanismen entwickelt haben, die im Sinne einer ökonomischen Ordnung die Produktion und Ausscheidung von Zellbestandteilen kontrollieren. So ermöglicht einerseits die Permeabilitätsbarriere die lebensnotwendige Anhäufung von Substanzen im Inneren der Zelle, und andererseits verhindern Kontrollmechanismen eine Überproduktion von Aminosäuren (NEIDHARDT et al. 1990).

Die Ära der mikrobiellen Aminosäureproduktion begann 1957, als Kinoshita und Mitarbeiter in Japan aus einigen tausend verschiedenen Mikroorganismen ein Bakterium selektionierten, das beim Wachstum auf einem einfachen Mineralsalzmedium mit Glukose als Kohlenstoff- und Energiequelle große Mengen L-Glutaminsäure ins Nährmedium ausscheidet (KINOSHITA et al. 1957). Dieses Bakterium, *Corynebacterium glutamicum*, produziert innerhalb von 2-3 Tagen über 100 g/l L-Glutaminsäure. Mikrobielle Verfahren konnten in den letzten Jahrzehnten auch für die Produktion anderer interessanter L-Aminosäuren wie L-Lysin oder L-Threonin entwickelt werden, in dem man z.B. geeignete Mutanten von *C. glutamicum* isolierte (LEUCHTENBERGER 1996). Die modernen Techniken des 'Metabolic Engineering' bieten heute verbesserte Möglichkeiten, leistungsfähige Bakterienstämme für die Herstellung von L-Aminosäuren zu entwickeln (SAHM 1993). Wir untersuchten in den letzten Jahren die Synthese von L-Lysin in *C. glutamicum* mit dem Ziel, von diesem Bakterium Stämme zu entwickeln, die zur Herstellung dieser für Mensch und Tier essentiellen Aminosäure besonders leistungsfähig sind.

2. Der Biosyntheseweg von L-Lysin in *C. glutamicum*

Wie aus Abb. 1 zu ersehen ist, gehört L-Lysin neben L-Methionin, L-Threonin und L-Isoleucin zu den Aminosäuren der Aspartat-Familie, deren Synthese von der gemeinsamen Vorstufe L-Asparaginsäure ausgeht. L-Asparaginsäure wird durch Transaminierung aus Oxalacetat gebildet, das über den Zitronensäurezyklus sowie die anaplerotischen Reaktionen im Zentralstoffwechsel bereitgestellt wird (siehe Kapitel 3).

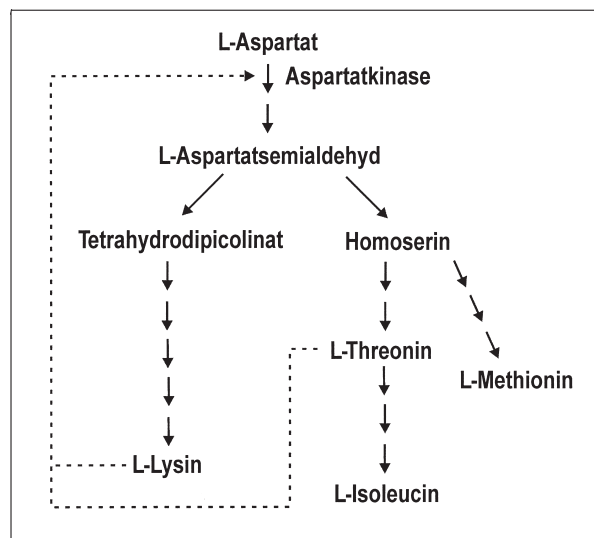


Abb. 1: Biosynthesewege von Aminosäuren der Aspartatfamilie und Regulation des Schlüsselenzyms: Aspartatkinase durch Endprodukthemmung (-----).

Die Synthese von L-Lysin wird über das erste Enzym im Biosyntheseweg, die Aspartatkinase, kontrolliert. Dieses Enzym wird in seiner Aktivität gehemmt, wenn mehr L-Lysin und L-Threonin in der Bakterienzelle vorhanden sind als für das Wachstum und die Vermehrung benötigt wird. Auf diese Weise ist das Bakterium *C. glutamicum* in der Lage, die Synthese dieser Aminosäuren bedarfsgerecht zu regulieren (CREMER et al. 1988). Wie eine Reihe von Untersuchungen ergeben haben, können relativ leicht Mutanten von *C. glutamicum* isoliert werden, bei denen diese Endprodukthemmung der Aspartatkinase nicht mehr vorhanden ist. Da die übrigen Enzyme des Lysinbiosynthesewegs in diesem Bakterium keiner weiteren Regulation unterliegen, können diese in der Aspartatkinase deregulierten Mutanten über 100 g/l L-Lysin unter entsprechend günstigen Kulturbedingungen ins Nährmedium ausscheiden (EGGELING 1994).

Um nun mit Hilfe gentechnischer Methoden gezielt die Lysinproduktion der bislang weitestgehend empirisch gewonnenen Mutantenstämme weiter steigern zu können, haben

wir in den letzten Jahren umfangreiche Untersuchungen zu den Stoffflüssen im Stoffwechsel von *C. glutamicum* ausgeführt. Dabei konnten wir nachweisen, daß in dem Aminosäure-produzierenden Bakterium *C. glutamicum* überraschenderweise zwei Wege für die Synthese von L-Lysin vorhanden sind (SCHRUMPF et al. 1991).

Wie aus Abb. 2 zu ersehen ist, wird die Lysinvorstufe meso-Diaminopimelat auf zwei verschiedenen Synthesewegen aus dem Stoffwechselzwischenprodukt Tetrahydrodipicolinat gebildet. Bei dem ersten Weg wird das Intermediat in einem Schritt durch die meso-Diaminopimelatdehydrogenase umgesetzt, während beim zweiten Weg vier Enzyme beteiligt sind und die Zwischenprodukte noch einen Succinatrest tragen. Mit Hilfe einer meso-Diaminopimelatdehydrogenase-negativen Mutante konnte gezeigt werden, daß die Kapazität des zweiten Weges ausreichend ist, um das für das Wachstum der Bakterienzellen notwendige L-Lysin zu synthetisieren. Die Ausscheidung von L-Lysin war jedoch in dieser Mutante um 20 % reduziert, was darauf hinweist, daß für eine hohe Lysinproduktion beide Lysinbiosynthesewege in *C. glutamicum* erforderlich sind.

Um den Kohlenstofffluß über diese beiden Wege zu quantifizieren, wurde das Bakterium auf ^{13}C -markierter Glukose kultiviert und anschließend das Markierungsmuster im

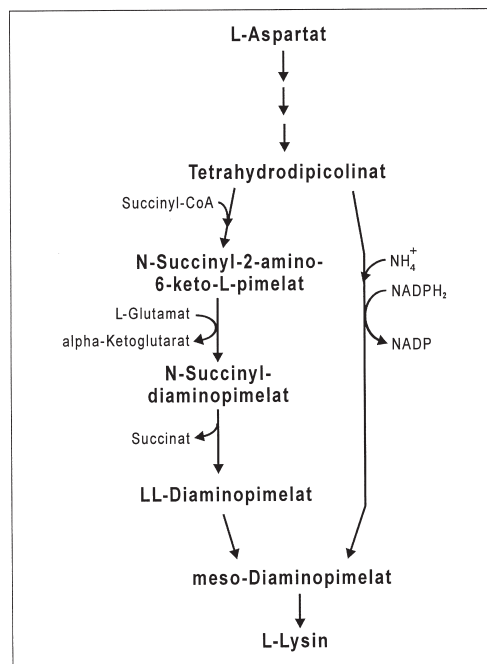


Abb. 2: Verzweigter Weg für die Biosynthese der Aminosäure L-Lysin in *Corynebacterium glutamicum*.

Kohlenstoffgerüst der Aminosäure L-Lysin mit Hilfe der NMR-Spektroskopie analysiert. Dabei zeigte es sich, daß in der Tat beide Lysinbiosynthesewege aktiv sind und über die meso-Diaminopimelatdehydrogenase etwa 30 % des produzierten L-Lysins synthetisiert wurden (SONNTAG et al. 1993). Eine detaillierte Analyse ergab aber, daß diese Stofffluß-verhältnisse über die beiden Biosynthesewege während einer Fermentation nicht konstant sind. Während zu Beginn der Fermentation über 70 % des gebildeten L-Lysins über den Dehydrogeaseweg gebildet wurden, war am Ende der Produktionsphase dieser Weg nur noch zu einem geringen Anteil an der Lysinbiosynthese beteiligt. Wie weitere Experimente ergaben, spielt die Ammoniumkonzentration im Nährmedium eine entscheidende Rolle bei der Aktivität dieser beiden Stoffwechselwege. Bei hoher Ammoniumkonzentration im Medium (>100 mM) erfolgt die L-Lysinbiosynthese vorwiegend über die meso-Diaminopimelatdehydrogenase, da dieses Enzym einen relativ hohen k_m -Wert für Ammoniumionen besitzt ($k_m = 36$ mM). Ist dagegen die Ammoniumkonzentration niedrig (< 50 mM), was häufig am Ende einer Fermentation der Fall ist, so wird das Lysin weitestgehend durch den 'Succinylaseweg' gebildet.

3. Anaplerotische Reaktionen in *C. glutamicum*

Von zentraler Bedeutung für eine effiziente Lysinbildung ist die Synthese des Intermediats Oxalacetat im Zentralstoffwechsel, da dies die Vorstufe für die Bildung von Aspartat darstellt. Bislang ging man davon aus, daß in *C. glutamicum* beim Wachstum auf Glukose oder Saccharose Oxalacetat für die Biosynthese von Aminosäuren aus Phosphoenolpyruvat und CO_2 gebildet wird, eine anaplerotische Reaktion, die durch das Enzym Phosphoenolpyruvat(PEP)-Carboxylase katalysiert wird (OZAKI und SHIO 1969) (Abb. 3). Kürzlich konnten wir jedoch zeigen, daß die PEP-Carboxylase nicht das einzige anaplerotische Enzym ist, das in *C. glutamicum* für die Bildung von Oxalacetat verantwortlich ist (PETERS-WENDISCH et al. 1993). Mutanten, bei denen das Gen für die PEP-Carboxylase mit Hilfe gentechnischer Methoden gezielt inaktiviert worden war, zeigten keinerlei Veränderungen in ihrem Wachstumsverhalten und in der Lysinbildung. Markierungsexperimente ergaben, daß in diesen Mutanten wie auch im Wildtyp eine weitere Carboxylierungsreaktion vorhanden ist. Nachdem im Rohextrakt von *C. glutamicum* zunächst keine Pyruvatcarboxylase-Aktivität nachgewiesen werden konnte, gelang es mit einem spezifischen Testsystem, in permeabilisierten Zellen dieses Enzym zu detektieren (PETERS-WENDISCH et al. 1997). Das Aminosäure-produzierende Bakterium besitzt somit neben der PEP-Carboxylase noch ein zweites anaplerotisches Enzym, die Pyruvatcarboxylase (Abb. 3). Dieses Biotin enthaltende Enzym katalysiert die Umsetzung von Pyruvat und Kohlendioxid zu Oxalacetat.

Wie quantitative Analysen dieser anaplerotischen Reaktion mit Hilfe der ^{13}C -NMR-Spektroskopie ergeben haben, spielt die Pyruvatcarboxylase bei der Synthese von Oxalacetat eine sehr viel größere Rolle als die bislang für diese Reaktion verantwortlich gemachte PEP-Carboxylase. So werden bei der L-Lysinproduktion in *C. glutamicum* etwa 85 % des Oxalacetats von der Pyruvatcarboxylase und nur 15 % von der PEP-Carboxylase gebildet (PETERSEN et al. 1999).

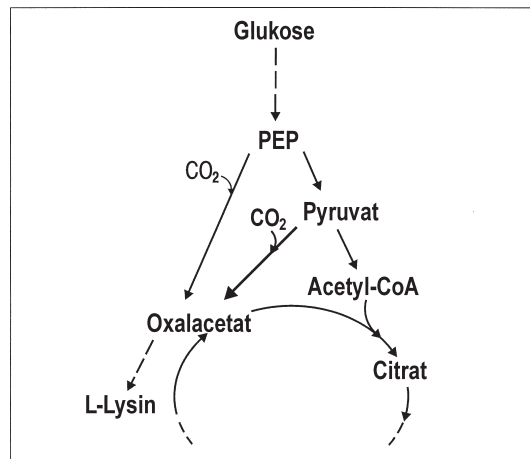


Abb. 3: Anaplerotische Reaktionen für die Synthese von Oxalacetat in *Corynebacterium glutamicum* (PEP: Phosphoenolpyruvat).

Wie aus Tabelle 1 zu ersehen ist, konnte durch Überexpression des Gens für die Pyruvatcarboxylase interessanterweise die Lysinbildung und auch die Glutamatbildung ganz erheblich gesteigert werden. Die Synthese von Oxalacetat scheint somit für die Produktion dieser beiden Aminosäuren ein 'Flaschenhals' zu sein, der durch Erhöhung der Pyruvatcarboxylase-Aktivität gezielt beseitigt werden kann.

Wie eine Reihe weiterer Enzymtests ergab, besitzt *C. glutamicum* aber nicht nur Enzyme für die Umsetzung von PEP bzw. Pyruvat und Kohlendioxid zu Oxalacetat sondern auch Enzyme, welche die umgekehrten Reaktionen katalysieren (PETERS-WENDISCH et al. 1997) (Abb. 4). So konnte in diesem Bakterium einerseits eine IDP/GDP-abhängige PEP-Carboxykinase nachgewiesen werden, die *in vivo* vermutlich bei der Glukoneogenese für die Decarboxylierung von Oxalacetat zu PEP verantwortlich ist. Andererseits besitzt *C. glutamicum* auch noch eine Oxalacetat-Decarboxylase, welche Oxalacetat zu Pyruvat und

Tab. 1: Erhöhte Lysin- und Glutamatbildung bei *C. glutamicum*-Stämmen, die das Gen für die Pyruvatcarboxylase überexprimieren.

Stamm	Pyruvatcarboxylase [mU/mg Protein]	Lysin [mM]	Glutamat [mM]
DG52-5(pVWEx)	10 ± 4	23 ± 3	
DG52-5(pVWExpyc)	176 ± 26	35 ± 3	
WT(pVWEx)			12 ± 2
WT(pVWExpyc)			78 ± 8

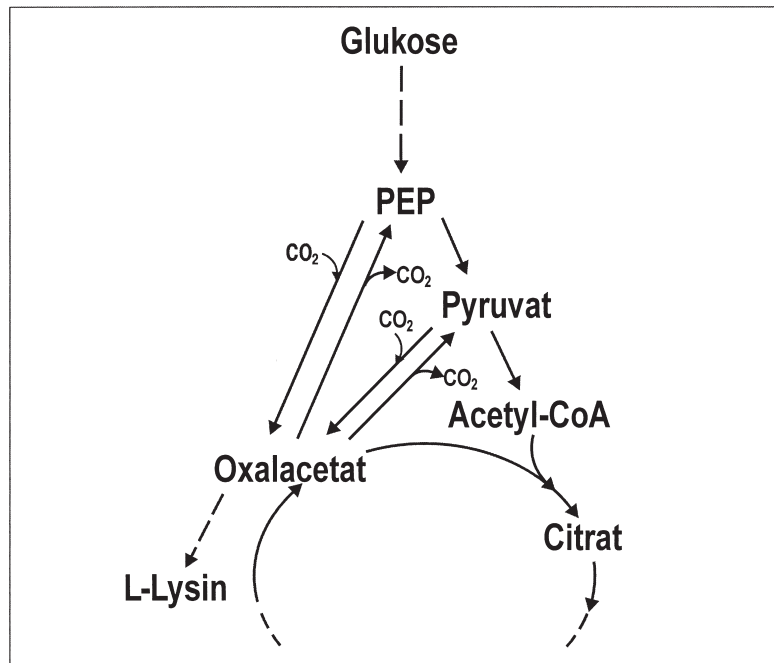


Abb. 4: Verschiedene Carboxylierungs- und Decarboxylierungsreaktionen bei der Umsetzung von Phosphoenolpyruvat (PEP) und Pyruvat bzw. Oxalacetat in *Corynebacterium glutamicum*.

CO_2 umgesetzt. Erstaunlicherweise haben erste Untersuchungen zur Quantifizierung dieser Decarboxylierungsreaktionen ergeben, daß etwa 60 % des gebildeten Oxalacetats über diese Rückreaktionen wieder zu PEP und Pyruvat umgewandelt werden. Welche Bedeutung dieser 'futile cycle' für das Wachstum und die Bildung von Aminosäuren hat, wird zur Zeit untersucht.

4. Export von L-Lysin bei *C. glutamicum*

Da das von *C. glutamicum* produzierte L-Lysin in hohen Konzentrationen (über 100 g/l) im Kulturmedium angehäuft wird, stellt sich die Frage, wie das L-Lysin aus der Bakterienzelle exportiert wird. Bis vor kurzem gab es nur sehr wenige Untersuchungen zum Export von Aminosäuren bei Bakterien. Lange Zeit wurde in der Literatur diskutiert, daß die Aminosäuren durch passive Diffusion vom Zellinnern ins Kulturmedium gelangen. So wurde für den Export der hydrophilen Aminosäure L-Lysin bei *C. glutamicum* die passive Diffusion mittels eines osmotisch kontrollierten Porenmodells diskutiert (LUNTZ et al. 1986) (Abb. 5). Eine andere Hypothese zum Export von Aminosäuren ist die ,Inversions-

hypothese', die auf der prinzipiellen Reversibilität von Transportprozessen analog zu enzymkatalysierten Reaktionen beruht. Sie geht von einem – bei Umkehrung der Gradienten – in Exportrichtung arbeitenden sekundären Aufnahmesystem aus (CLEMENT et al. 1984). Diese Vorstellung konnte jedoch dadurch widerlegt werden, daß eine Mutante mit einem defekten Lysinaufnahmesystem noch in der Lage war, L-Lysin zu exportieren (SEEP-FELDHAUS et al. 1991). Mit biochemischen Methoden konnte vor einigen Jahren gezeigt werden, daß *C. glutamicum* neben entsprechenden Aminosäure-Aufnahmecarriern auch spezifische Aminosäure-Exportcarrier für L-Glutaminsäure, L-Isoleucin und L-Lysin besitzt (KRÄMER 1994). Die Charakterisierung des Lysinexports in diesem Bakterium ergab, daß es sich hierbei um einen sekundären Transportprozeß handelt, bei dem L-Lysin im Symport mit zwei Hydroxyl-Ionen über die Cytoplasmamembran transportiert wird. Die treibende Kraft für diesen Transport stellt das Membranpotential dar (BRÖER und KRÄMER 1991).

Kürzlich gelang es uns, das Gen für den Lysinexportcarrier von *C. glutamicum* zu isolieren (VRLJIC et al. 1996). Wie Sequenzanalysen ergaben, kodiert dieses Gen im Vergleich zu anderen Carrierproteinen nur für ein relativ kleines Polypeptid mit 236 Aminosäuren. Erste Computeranalysen zur Struktur ergaben, daß dieses stark hydrophobe Protein sechs potentielle transmembrane Bereiche hat. Detaillierte experimentelle Untersuchun-

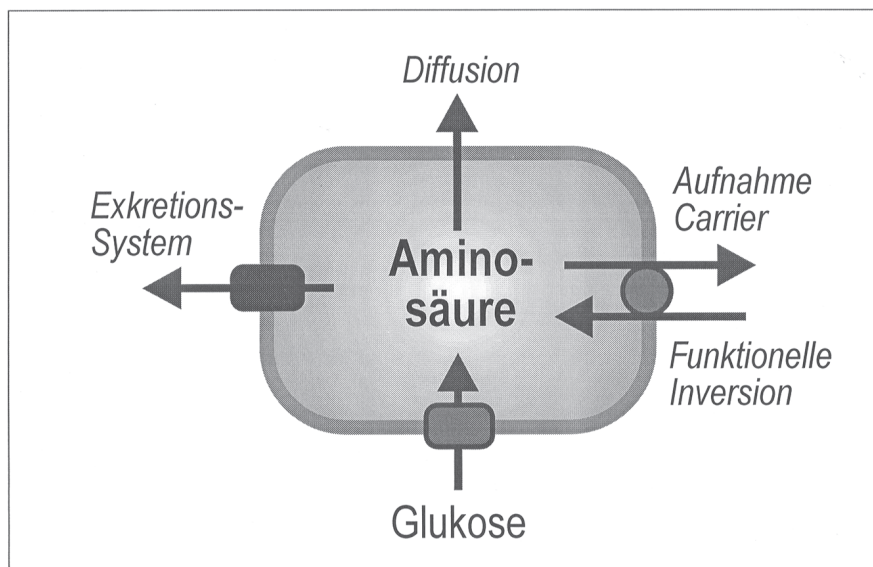


Abb. 5: Mögliche Exportsysteme für Aminosäuren bei *Corynebacterium glutamicum*.

gen zeigten jedoch, daß dieses Exportcarrierprotein nur fünf membrandurchgängige Bereiche besitzt; das sechste transmembrane Segment ist vermutlich der äußeren Cytoplasmamembran aufgelagert (Abb. 6). Ein Vergleich der ermittelten Gensequenz mit anderen bekannten Gensequenzen ergab, daß dieses Gen keine Ähnlichkeit zu Genen bekannter Funktion aus anderen Organismen zeigt. Es scheint sich hierbei um eine neue Familie von Proteinen zu handeln, die für den Export von niedermolekularen Substanzen verantwortlich sind (VRLJIC et al. 1999).

Mutanten, bei denen das Gen für den Lysinexportcarrier deletiert worden war, konnten kein L-Lysin mehr ins Kulturmedium ausscheiden (VRLJIC et al. 1996). Dieses Carrierprotein ist somit für den Lysinexport essentiell. Bei einer Diffusionskonstanten für L-Lysin von $k = 1,9 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$ ist die Diffusion dieser Aminosäure durch die Cytoplasmamembran vernachlässigbar. Durch Überexpression dieses Gens konnte die Lysinexportrate um den Faktor sechs im Vergleich zum Ausgangsstamm gesteigert werden. Dies ist von großem wirtschaftlichen Interesse, weil es Hinweise gibt, daß bei den zur Zeit für die Lysinproduktion verwendeten Bakterienstämmen der Export dieser Aminosäure ein limitierender Faktor ist. Nach Isolierung des Lysinexportcarrier-Gens besteht nun die Möglichkeit, diesen Engpaß gezielt zu überwinden und damit die Leistungsfähigkeit von Lysinproduzenten erheblich zu verbessern.

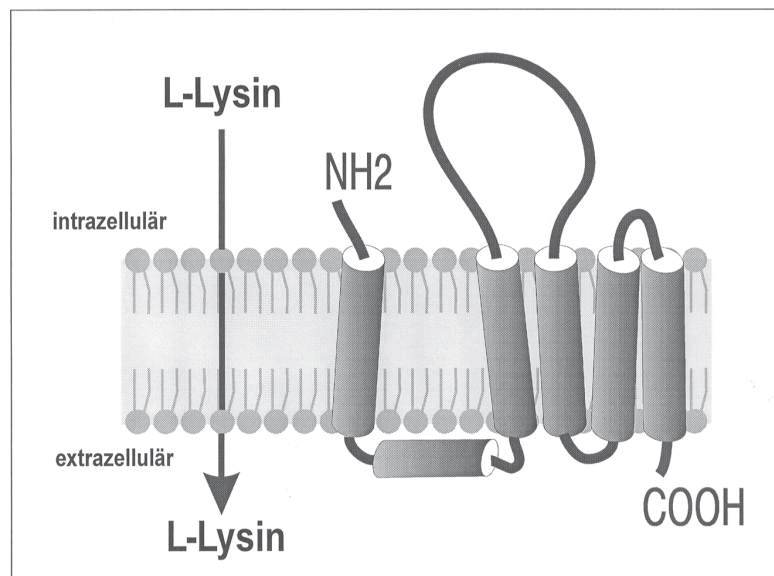


Abb. 6: Strukturmodell des L-Lysin-Exportcarriers in *Corynebacterium glutamicum*.

5. Ausblick

Während bislang die Bakterienstämme zur Herstellung von Aminosäuren weitestgehend empirisch durch Mutation und Selektion entwickelt wurden, ermöglichen heutzutage detaillierte Kenntnisse der Stoffwechselwege sowie deren Regulation eine gezielte Stammverbesserung (Metabolic Engineering) mit Hilfe gentechnischer Methoden. So können Engpässe in den Biosynthesewegen der Aminosäuren oder im Zentralstoffwechsel durch Überexpression der entsprechenden Gene beseitigt werden. Da auch der Transport von Aminosäuren aus der Bakterienzelle in das Kulturmedium bei der effizienten Produktion ein limitierender Faktor sein kann, müssen in Zukunft auch die Exportsysteme für die Aminosäuren in den Produktionsstämmen durch Anwendung der Gentechnik verbessert werden.

Nachdem in den letzten Jahren Methoden entwickelt wurden, die innerhalb weniger Monate eine vollständige Erfassung der genetischen Information eines Bakteriums (Genomsequenzierung) ermöglichen, wird zur Zeit auch das Genom des Aminosäureproduzierenden Bakteriums *C. glutamicum* sequenziert. Dadurch wird ein völlig neues Methodenarsenal erschlossen, mit dem weitere Engpässe im Stoffwechsel der Produktionsstämme identifiziert werden können. So wird die Expression der 3000 verschiedenen Gene in einer Bakterienzelle mit der DNA-Chip-Technologie meßbar sein. Mit Hilfe der DNA-Chips wird man insbesondere mehr Informationen zu den globalen Regulationsmechanismen erhalten, die bislang nicht bekannt und verstanden sind. Ferner bietet die Proteomforschung mit der 2D-Gelelektrophorese sowie der Massenspektroskopie (MALDI-TOF) eine sehr effiziente Möglichkeit, die vielen verschiedenen Proteine, die in den Bakterien unter verschiedenen Bedingungen gebildet werden, zu analysieren. Auf der Grundlage all dieser zusätzlichen Daten wird dann eine weitere gezielte Verbesserung der Bakterienstämme zur Herstellung von Aminosäuren erfolgen können.

Literatur

- BRÖER, S., KRÄMER, R. (1991): Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*. Energetics and mechanism of the transport system. Eur. J. Biochem. **202**, 137-143.
- CLEMENT, Y., ESCOFFIER, C., TROMBE, M.C., LANELLE, G. (1984): Is glutamate excreted by its uptake system in *Corynebacterium glutamicum*? A working hypothesis. J. Gen. Microbiol. **130**, 2589-2594.
- CREMER, J., TREPTOW, C., EGGELING, L., SAHM, H. (1988): Regulation of enzymes of lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. J. Gen. Microbiol. **134**, 3221-3229.
- EGGELING, L. (1994): Biology of L-lysine overproduction with *Corynebacterium glutamicum*. Amino Acids **6**, 261-272.
- ESAKI, N., NAKAMORI, S., KURIHARA, T., FURUYOSHI, S., SODA, K. (1996): Enzymology of Amino Acid Production. In: Biotechnology, VCH-Verlag Weinheim, Vol. **6**, 503-560.
- KINOSHITA, S., UKADA, S., SHIMONO, M. (1957): Studies on the amino acid fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. J. Gen. Appl. Microbiol. **3**, 139-205.
- KIRCHER, M., LEUCHTENBERGER, W. (1998): Aminosäuren – ein Beitrag zur Welternährung. Biotechnologie in unserer Zeit, 28. Jahrg. Nr. **5**, Wiley-VCH-Verlag.

- KRÄMER, R. (1994): Secretion of amino acids by bacteria: Physiology and mechanism. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**, 75-94.
- LEUCHTENBERGER, W. (1996): Amino Acid – Technical Production and Use. In: *Biotechnology*, VCH-Verlag Weinheim, Vol. **6**, 465-502.
- LUNTZ, M.G., ZHDANOVA, N.I., BOURD, I. (1986): Transport and excretion of L-lysine in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 2137-2146.
- NEIDHARDT, F., INGRAHAM, J., SCHAECHTER, M. (1990): *Physiology of the Bacterial Cell. A Molecular Approach*. Sinauer Associates, Inc. – Publishers Sunderland, Massachusetts.
- OZAKI, H., SHIO, I. (1969): Regulation of the TCA and glyoxylate cycle in *Brevibacterium flavum*. II. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate kinase. *J. Biochem.* **66**, 297-311.
- PETERSEN, S., DE GRAAF, A.A., MÖLLNEY, M., KOWNATZKI, D., WIECHERT, W., SAHM, H. (1999): NMR-based analysis of *in vivo* anaplerotic activities in *Corynebacterium glutamicum*. Sonderausgabe zur Jahrestagung der VAAM 1999, Göttingen.
- PETERS-WENDISCH, P., EIKMANN, B.J., THIERBACH, G., BACHMANN, B., SAHM, H. (1993): Phosphoenolpyruvate carboxylase in *Corynebacterium glutamicum* is dispensable for growth and lysine production. *FEMS Microbiol. Lett.* **112**, 269-274.
- PETERS-WENDISCH, P., WENDISCH, V., PAUL, S., EIKMANN, B., SAHM, H. (1997): Pyruvate carboxylase as an anaplerotic enzyme in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **143**, 1095-1103.
- SAHM, H. (1993): Metabolic Design. In: *Biotechnology*, VCH-Verlag Weinheim, Vol. **1**, 189-220.
- SCHRUMPF, B., SCHWARZER, A., KALINOWSKI, J., PÜHLER, A., EGGELING, L., SAHM, H. (1991): A functional split pathway for lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **173**, 4510-4516.
- SEEP-FELDHAUS, A.H., KALINOWSKI, J., PÜHLER, A. (1991): Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum lysI* gene involved in lysine uptake. *Mol. Microbiol.* **5**, 2995-3005.
- SONNTAG, K., EGGELING, L., DE GRAAF, A.A., SAHM, H. (1993): Flux partitioning in the split pathway of lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: Quantification by ¹³C- and ¹H-NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* **213**, 1325-1331.
- URLJIC, M., GARG, J., BELLMANN, A., WACHI, S., FREUDL, R., MALECKI, M.J., SAHM, H., KOZINA, V.J., EGGELING, L., SAIER JR., M.H.: The LysE superfamily: Topology of the lysine exporter LysE of *Corynebacterium glutamicum*, a paradigm for a novel superfamily of transmembrane solute translocators (im Druck).
- URLJIC, M., SAHM, H., EGGELING, L. (1996): A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* **22**, 815-826.

Prof. Dr. rer. nat. Hermann Sahm
 Institut für Biotechnologie · Forschungszentrum Jülich
 D-52425 Jülich, Germany
<http://www.fz-juelich.de/ibt/ibt.html> · e-mail: h.sahm@fz-juelich.de